

УДК [575.1/.2:577.1]:576.895.10

© 1990

МНОЖЕСТВЕННЫЕ ФОРМЫ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ-НАД-ЗАВИСИМОЙ У ТРЕХ ВИДОВ ТРЕМАТОД РОДА NOTOCOTYLUS (TREMATODA: NOTOCOTYLIDAE)

А. П. Паулаускас

Проведено электрофоретическое изучение малаздегидрогеназы-НАД-зависимой трех видов трематод — *Notocotylus attenuatus*, *N. ephemera*, *N. imbricatus*. В спектрах МДГ каждого вида соответственно выявлено до 15, 16 и 11 изоферментных фракций, различающихся по электрофоретической подвижности. Они располагаются в 7 зонах и генетически контролируются 7 полиморфными локусами. Анализ денситограмм изоферментов МДГ показал, что относительная ферментная активность медленно мигрирующих изоформ (1—3-я) зоны в 10 и более раз превышает таковую быстро мигрирующих изоформ (4—7-я зоны). Установлено, что генотипы марируют по изоферментам МДГ внутри клона идентичны независимо от того, в каком хозяине они развивались. Спектры МДГ у исследованных видов нотокотилид отличаются по изоформам медленно мигрирующих трех зон.

Фермент малаздегидрогеназа-НАД-зависимая (К. Ф. 1.1.1.37., МДГ) обнаружен как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных. Установлено, что у трематод МДГ участвует в основном метаболическом пути преобразования химической энергии пищи в процессе гликолиза, катализируя превращение малата в оксалоацетат и поддерживая необходимое соотношение $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ в цитозоле (Выхрестюк и др., 1986; Lloyd, 1986). У разных видов млекопитающих, птиц, рыб, насекомых и других беспозвоночных животных описан полиморфизм по МДГ (Корочкин и др., 1977; Маурер, 1971; Алтухов, 1971; Филиппович, Коночев, 1987). Имеются сообщения о существовании изоферментов МДГ и у гельминтов (Выхрестюк и др., 1986; Dhandayuthapani e. a., 1983; Fletcher e. a., 1981; Boissezon de, Jelnes, 1982; Bray, Rollinson, 1985; Leslie e. a., 1982; Leon e. a., 1988). Для гельминтов характерны многообразие и подвижность метаболических путей, что, по-видимому, обусловлено существованием феномена смены сред обитания (в том числе и животных хозяев) в процессе реализации их жизненного цикла. Это обстоятельство делает каждую конкретную паразито-хозяинную систему уникальной. В доступной нам литературе сообщений о множественных формах МДГ нотокотилид найти не удалось. Ранее нами были изучены неспецифические эстеразы (К. Ф. 3.1.1.), НАДФ-зависимая малаздегидрогеназа (К. Ф. 1.1.1.40.) и белковый спектр трематод *Notocotylus attenuatus*, *N. ephemera* (Паулаускас, 1988).

Целью настоящей работы явилось изучение фермента МДГ трематод *Notocotylus attenuatus* (Rudolphi, 1809), *N. ephemera* (Nitzsh, 1807), *N. imbricatus* (Looss, 1893).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Моллюски *Lymnaea stagnalis*, *Planorbis corneus*, *Bithynia inflata* были собраны на территории Литовской ССР. От каждого спонтанно зараженного

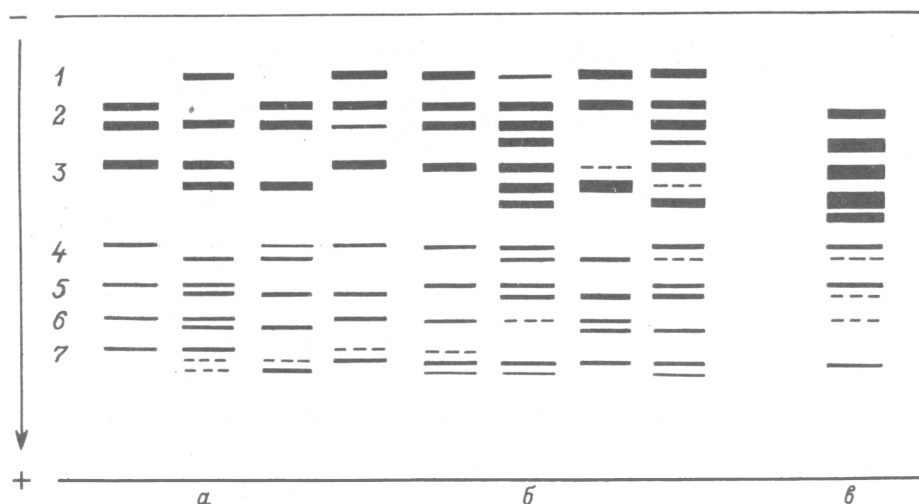


Рис. 1. Схематическое изображение выявленных изоферментов МДГ у 3 видов нотокотилид.
a — *N. attenuatus*; *б* — *N. ephemera*; *в* — *N. imbricatus*; 1 — Mdh 1; 2 — Mdh 2; 3 — Mdh 3; 4 — Mdh 4;
 5 — Mdh 5; 6 — Mdh 6; 7 — Mdh 7.

Fig. 1. Diagrammatical representation of recognized isoenzymes of MDH in three species of Notocotylidae.

нотокотилидами моллюска в лабораторных условиях получали подростки, которыми экспериментально заражали домашних утят пекинской породы и домашних гусей. Для получения клонов маринованных птиц заражали индивидуально по 300 подростков, выделенных одним моллюском и через 12 дней вскрывали. Проведен анализ 124 клонов нотокотилид от 181 хозяина.

Нотокотилид, полученных от одной птицы, гомогенизировали в 40 %-ной сахарозе и тритоне $\times 100$ (1 : 1 : 1). Для электрофоретического анализа использовали по 30 мкл гомогената.

Электрофорез проводили в двухслойном вертикальном блоке 2.5 7.5 %-ного полиакриламидного геля, используя буферную систему (Маурер, 1971): электролитный буфер — трис-глицин pH 8.3, гелевый буфер для концентрирующего геля — трис-HCl pH 6.7, для разделяющего геля — трис-HCl pH 8.9. Красящие смеси для выявления ферментов МДГ готовили, используя 50 мг малата натрия, 20 мг НАД, 5 мг феназинметасульфата, 20 мг нитросинего тетразолия в 50 мл 0.5 М трис-HCl буфера pH 7.5 и 50 мл дистиллированной воды.

Относительную ферментную активность (А) изоферментов МДГ определяли по денситограммам. Денситометрирование электрофореграмм проводили на спектрофотометре «DU-8 В» (фирма Beckman, США), при длине волны сканирования 550 нм. Расположение изоферментных фракций на электрофореграмме оценивали по относительной электрофоретической подвижности (Rf). За единицу брали наиболее часто встречаемую у исследованных нотокотилид медленную фракцию изоферментов МДГ 5-й зоны.¹

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После электрофоретического исследования гомогенатов половозрелых нотокотилид на электрофореграммах выявлено 7 зон с малатдегидрогеназной активностью (рис. 1). У *N. attenuatus* обнаружено до 15 изоферментных фракций,

¹ Автор искренне благодарит А. Сруога за оказанную помощь при выполнении работы, Д. Буткаускаса, Л. Венслаускене, Г. Вишневскую, И. Дубаускайте за помощь при сборе материала, Д. Райшите за помощь при определении видов нотокотилид.

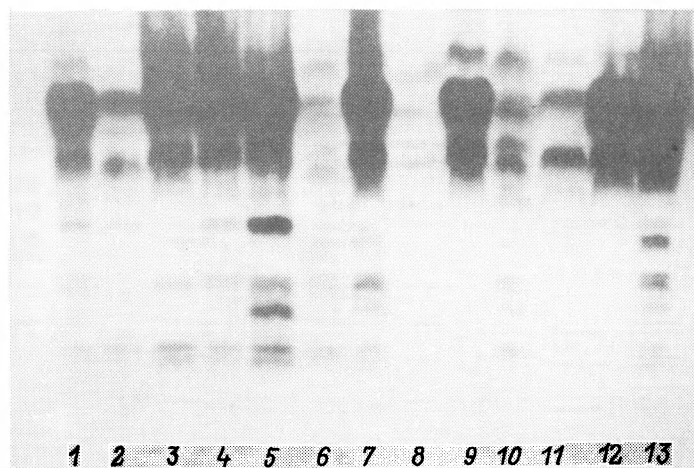


Рис. 2. Спектры изоферментов МДГ *N. ephemera*, развивавшихся в разных окончательных хозяевах.

Пояснения см. в тексте.

Fig. 2. Spectra of isoenzymes of MDH of *N. ephemera* developing in different obligate hosts. у *N. ephemera* — 16, у *N. imbricatus* — 11. Изоферменты 4—7-й зон всех трех видов нотоколид мигрируют к аноду с одинаковой электрофоретической подвижностью. Изоферменты МДГ *N. imbricatus* 2—3-й зон мигрируют быстрее и соответственно характеризуются более высокой относительной электрофоретической подвижностью, чем аналогичные изоферменты двух других видов. В 1-й зоне у *N. imbricatus* изоферменты совсем не обнаружены.

Генетико-популяционный анализ изоферментов МДГ нотоколид показал, что каждая изоферментная зона МДГ контролируется отдельным генетическим локусом. Так, у *N. attenuatus*, *N. ephemera* в 1-й зоне обнаружена только одна изоферментная фракция, притом не у всех исследованных клонов *N. attenuatus* она выявлена. У некоторых из исследованных клонов *N. ephemera* она проявляется очень слабо (рис. 2, 2). Данное обстоятельство дает основание предположить: 1) существование рецессивной нулевой аллели $Mdh\ 1^0$, 2) данные изоферменты контролируются двумя аллелями $Mdh\ 1^A$, $Mdh\ 1^0$.

У *N. attenuatus* во 2—6-й зонах обнаружено по два изофермента в каждой зоне. У гомозиготных по определенному локусу клонов нотоколид выявлено по одной (быстрой или медленной) фракции, у гетерозигот — две фракции, что свидетельствует о том, что синтез изоферментов данных зон контролируется двумя аллелями А и В определенного локуса: $Mdh\ 2$, $Mdh\ 3$, $Mdh\ 4$, $Mdh\ 5$, $Mdh\ 6$. В 7-й зоне обнаружены три изофермента, но у гомозигот выявлена быстрая, медленная или средняя изоформа, а у гетерозигот — быстрая и средняя, средняя и медленная или все три. Такое расположение изоферментов характерно для изоферментов, которые кодируются тремя аллелями, т. е. $Mdh\ 7^A$, $Mdh\ 7^B$, $Mdh\ 7^C$.

У *N. ephemera* во 2—3-й зонах обнаружены 1—3 изофермента. Вероятно, они контролируются тремя аллелями А—С локусов $Mdh\ 2$, $Mdh\ 3$. В зонах 4—6-й обнаружены 1—2 изофермента, которые генетически контролируются аллелями А и В локусов $Mdh\ 4$, $Mdh\ 5$, $Mdh\ 6$. В зоне 7 у отдельных клонов наряду с двумя четко выявленными быстрыми фракциями встречается слабо выраженная, медленно движущаяся изоферментная фракция, что дает основание говорить о существовании трех аллелей А—С локуса $Mdh\ 7$.

В связи с тем что при заражении птиц подростками *N. imbricatus* не удалось получить достаточное количество клонов для популяционно-генетического анализа, полная генетическая детерминация изоферментов МДГ данного вида нотоколид не была проведена.

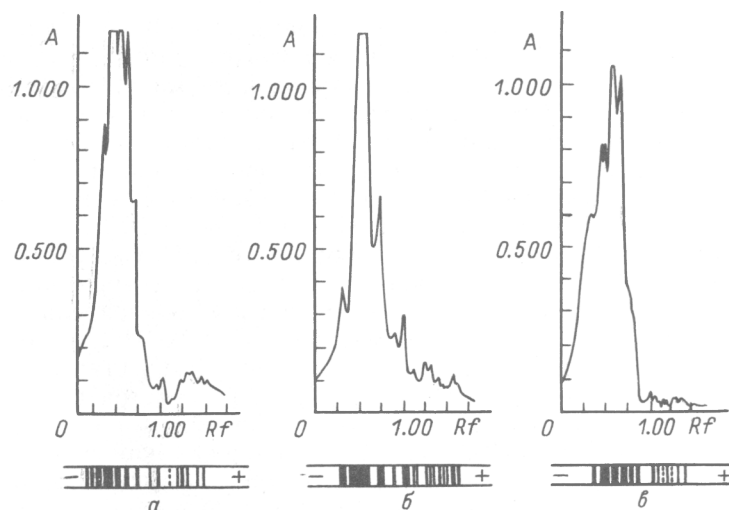


Рис. 3. Денситограммы МДГ 3 видов нотокотилид.

По оси абсцисс — относительная электрофоретическая подвижность изоферментов (R_f); по оси ординат — относительная ферментная активность (A) изоферментов МДГ. Остальные обозначения, как на рис. 1.

Fig. 3. Densitograms of MDH of Notocotylidae.

Анализ денситограмм изоферментов МДГ всех трех видов нотокотилид показал, что изоферменты МДГ по относительной ферментной активности разделяются на две группы: с высокой и низкой активностью (рис. 3). Очень большой активностью обладают медленно мигрирующие ($R_f < 0.80$) изоферменты, т. е. изоферменты 1—3-й зон. Их относительная ферментная активность в 10 и более раз выше, чем у быстро мигрирующих изоферментов 4—7-й зон (см. таблицу). Данной особенностью обладают изоферменты всех исследованных клонов всех трех видов нотокотилид. При этом у изоферментов *N. ephemera*, *N. imbricatus* 5-й зоны установлена более высокая активность, чем у изоферментов 6-, 7-й зон.

Относительная ферментная активность A изоферментов МДГ нотокотилид

Relative activity A of isoenzymes of MDH in Notocotylidae

Зона	<i>N. attenuatus</i>		<i>N. ephemera</i>		<i>N. imbricatus</i>	
	R_f	A	R_f	A	R_f	A
1	0.24	0.881	0.24	0.692		
2	0.32	0.318	0.32	1.270	0.32	0.608
	0.38	1.609	0.38	0.747		
	0.46	1.207	0.46	0.399	0.46	0.838
3					0.50	0.844
	0.54	1.069	0.54	0.823		
	0.58	0.875	0.58	0.598	0.58	1.070
4	0.68	0.234	0.68	0.628	0.68	1.060
	0.80	0.314	0.80	0.260	0.80	0.365
			0.88	0.206		
5	0.93	0.073			0.93	0.042
	1.00	0.092	1.00	0.312	1.00	0.068
6	1.12	0.045	1.12	0.171	1.12	0.044
	1.16	0.092	1.16	0.091		
7	1.20	0.097	1.20	0.078		
	1.24	0.101	1.24	0.185	1.24	0.046
	1.28	0.115	1.28	0.072	1.28	0.044

Как установили Санчес-Морено с соавторами (Sanchez-Moreno e. a., 1988, Leon e. a., 1988), исследовав МДГ нематод *Toxocara canis*, *T. cati*, *Toxascaris leonina*, *Ascaris suum*, цетод *Monesia expansa* и трематод *Fasciola hepatica*, изоферменты МДГ существуют в двух разных молекулярных формах — растворимой s-MDH и митохондриальной m-MDH, которые обладают различной ферментной активностью. У исследованных видов гельминтов активность изоферментов s-MDH была выше активности m-MDH. Аналогичные результаты получены и другими исследователями (Barrett, Beis, 1973; Rotman, 1978). Но есть работы (Prichard, Schofield, 1968; Probert, Lewis, 1977), в которых сообщается, что у *F. hepatica* установлена сходная ферментная активность s-MDH и m-MDH. Опираясь на то, что в основном у половозрелых гельминтов, как упомянуто выше, активность s-MDH выше, чем m-MDH, и на то, что растворимая форма (s-MDH) преимущественно участвует в восстановлении оксалоацетата из малата (Karlan, 1961) (мы в качестве субстрата при выявлении изоферментов использовали малат натрия), можно предположить, что медленно движущиеся изоферменты 1—3-й зон, обладающие высокой ферментной активностью, — изоферменты растворимой молекулярной формы s-MDH, а быстро мигрирующие (4—7-й зон) — изоферменты митохондриальной формы m-MDH.

При сравнении генотипов по изоферментам МДГ нотокотилид, полученных от одного моллюска, но выращенных в разных особях облигатного хозяина, было установлено, что изоферментные спектры МДГ исследованных нотокотилид внутри клона идентичны независимо от того, в каком окончательном хозяине они развивались (рис. 2). 1—6-й спектры изоферментов МДГ получены от марит *N. ephemera*, развивавшихся в утках, 7—13-й — в гусятах. 6—8-, 10-й спектры МДГ нотокотилид, клонированных от одного моллюска, 11—13-й — от другого, остальные спектры МДГ марит от разных клонов. Клоны *N. attenuatus* также обладают генетической однородностью по изоферментам МДГ. Схожие результаты мы получили при исследовании генетической однородности нотокотилид по анализу электрофоретических спектров белков (Паулаускас, Сруога, 1988).

Сравнение изоферментных спектров МДГ обследованных видов нотокотилид (рис. 1) показало, что у всех трех видов изоферменты 4—7-й зон обладают одинаковой электрофоретической подвижностью, сходными генетическими вариантами изоферментов, а также активностью. Различаются данные виды в основном по медленно мигрирующим изоферментам: *N. attenuatus* отличается от *N. ephemera* главным образом по генетическим вариантам изоферментов локусов Mdh 1, Mdh 2, Mdh 3. Что же касается *N. imbricatus*, то его изоферменты, характеризующиеся низкой электрофоретической подвижностью, мигрируют к аноду все-таки быстрее, чем аналогичные ферменты двух других видов. Это свидетельствует о разной генетической детерминации обсуждаемых изоферментов.

В отличие от изоферментов МДГ облигатных хозяев нотокотилид — утиных изоферментная система МДГ нотокотилид по числу изоферментов намного многочисленнее. У утиных изоферменты МДГ контролируются только двумя генными локусами s-Mdh, m-Mdh, при этом последний — мономорфный (Kuroda e. a., 1982; Numchi e. a., 1983; наши данные). Предполагаем, что существование такого широкого и полиморфного спектра МДГ у нотокотилид связано с биологией паразитов, со сменой среды обитания. Как известно, среда обитания у нотокотилид меняется четыре раза (Филимонова, 1985). Яйца нотокотилид выводятся из окончательного хозяина во внешнюю среду, оттуда попадают в организм первого промежуточного хозяина — моллюска, в котором развиваются партениты. Завершившие свое формирование церкарии снова выходят во внешнюю среду. Здесь они инцистируются, превращаясь в адолескарий, которыми и заражается окончательный хозяин (теплокровные животные). В последнем мариты достигают половой зрелости.

Установлено (Корочкин, 1976), что некоторые гены активны на определенной стадии развития организма. По-видимому, в жизненном цикле нотокотилид, при том, что каждая фаза существует в конкретной среде, на определенных этапах проявляют свою генетическую активность и определенные локусы ферментной системы МДГ и соответственно в превращении малата в оксалоацетат участвуют определенные изоферменты.

Известно, что широкий спектр создает большие возможности для адаптивной эволюции (Ратнер и др., 1985). Весьма вероятно, что у нотокотилид широкий изоферментный спектр МДГ сформировался в процессе эволюции, что может рассматриваться как адаптация паразитов к реализации своего чрезвычайно сложного жизненного цикла в условиях гетерогенной среды, где переход от существования в одних условиях к другим совершается очень быстро. Это особенно важно, если учесть, что фермент МДГ, как уже говорилось выше, участвует в основном метаболическом пути.

Наличие у нотокотилид широкого многолокусного и полиморфного спектра МДГ позволяет использовать данную изоферментную систему в популяционно-генетическом анализе трематод сем. *Notocotylidae*. Результаты анализа генетической изменчивости МДГ исследованных видов нотокотилид будут изложены в следующем сообщении.

Список литературы

- Алтухов Ю. П. Популяционная генетика рыб. М.: Пищ. промышл., 1974. 247 с.
- Выхрестюк Н. П., Буренина Э. А., Ярыгина Р. В. Малатдегидрогеназа и лактатдегидрогеназа у трематод и турбеллярии // Журн. эволюц. биохим. и физиол. 1986. Т. 22, № 1. С. 24—29.
- Корочкин Л. И. Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1976. 280 с.
- Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. В. и др. // Генетика изоферментов (Сб. ст.). М.: Наука, 1977. 275 с.
- Маурер Г. Диск-электрофорез. М.: Мир, 1971. 247 с.
- Паулаускас А. П. Электрофоретическое исследование белков и ферментов трематод *Notocotylus attenuatus* (Rudolphi, 1809), *N. ephemer* (Nitzsch, 1807) // Тр. АН ЛитССР. Сер. В. 1988. Т. 1 (101). С. 111—115.
- Паулаускас А. П., Сруога А. Исследование генетической однородности трематод рода *Notocotylus*, клонированных от одного моллюска // Проблемы экологического мониторинга и генетические аспекты орнитофауны и других организмов (Тез. докл. конф. 2 ноября 1988). Вильнюс, 1988. С. 100.
- Ратнер В. А., Жарких А. А., Колчанов Н. А. и др. Проблемы теории молекулярной эволюции. Новосибирск: Наука, 1985. 263 с.
- Филимонова А. В. Трематоды фауны СССР. Нотокотилиды. М.: Наука, 1985. 127 с.
- Филиппович Ю. Б., Коночев А. С. Множественные формы ферментов насекомых и проблемы сельскохозяйственной энтомологии. М.: Наука, 1987. 168 с.
- Baggett J., Beis I. The redox state of free nicotinamide adenine dinucleotide couple in the cytoplasm and mitochondria of muscle tissue from *Ascaris lumbricoides* (Nematoda) // Comp. Biochem. Physiol. 1973. Vol. 44a. P. 331—340.
- Boissezon de B., Jelnes J. E. Isoenzyme studies on cercariae from monoinfections and adult worms of *Schistosoma mansoni* (10 isolates) and *S. rodhaini* (one isolate) by horizontal polyacrylamide gel electrophoresis and staining of eight enzymes // Z. Parasitenkd. 1982. Vol. 67. P. 185—196.
- Bray R. A., Rollinson D. Enzyme electrophoresis as an aid to distinguishing species of *Fellodistomum*, *Steringotrema* and *Steringophorus* (Digenea: Fellodistomidae) // Inter. J. Parasitol. 1985. N 3. P. 255—263.
- Dhandayuthapani S., Balasubramanian M. P., Nellaiappan K., Ramalingam Y. K. Isozyme pattern of lactate and malate dehydrogenases of *Gastrothylax crumenifer* (Trematoda: Amphistomatidae) from different hosts // Vet. Parasitol. 1983. Vol. 12, N 1. P. 65—69.
- Fletcher M., Loverde P. T., Woodruff D. S. Genetic variation in *Schistosoma mansoni*: enzyme polymorphisms in populations from Africa, Southwest Asia, South America and the Caribbean // Am. J. Trop. Med. Hyg. 1981. Vol. 30, N 2. P. 406—421.
- Kaplan N. O. Mechanism of action of steroid hormones. Oxford, 1961. 000 с.
- Kuroda N., Kokizawa R., Hori H., Osaka Y., Usuda N., Utida S. Evolution of mitochondrial malate dehydrogenase in birds // J. Yamashina Inst. Ornith. 1982. Vol. 14, N 63. P. 1—15. •

- Leon P., Monteoliva M., Sanchez-Moreno M. Isoenzymes of malate dehydrogenase (E. C. 1.1.1.37) of adult nematodes // Int. J. Parasitol. 1988. Vol. 18, N 1. P. 65—68.
- Leslie J. F., Cain G. D., Meffe G. K., Vrijenhaek R. C. Enzyme polymorphism in *Ascaris suum* (Nematoda) // J. Parasitol. 1982. Vol. 68, N 4. P. 576—587.
- Lloyd G. M. Energy metabolism and its regulation in the adult liver fluke *Fasciola hepatica* // Parasitology. 1986. Vol. 93, N 1. P. 217—248.
- Numchi K., Watada M., Kakizawa R., Kuroda N., Utida S. Evolutionary genetics of the Anatidae // Tori. 1983. Vol. 32, N 2/3. P. 63—74.
- Prichard R., Schofield P. The metabolism of phosphoenol—pyruvate in the adult fluke *Fasciola hepatica* // Biochim. Biophys. Acta. 1968. N 170. P. 63—76.
- Probert A. J., Lewis T. *Fasciola hepatica*: the subcellular distribution and kinetic and electrophoretic properties of malate dehydrogenase // Exp. Parasitol. 1977. Vol. 41. P. 89—94.
- Rotman J. P. *Schistosoma mansoni*: purification and characterization of malate dehydrogenase // Exp. Parasitol. 1978. Vol. 46. P. 31—48.
- Sanchez-Moreno M., Tejada P., Garcia-Ruiz M. A., Monteoliva M. Isolation and purification of malate dehydrogenase in helminth parasites // Wiadomosci Parazytologiczne. 1988. N 2. P. 113—124.

Институт зоологии и паразитологии АН ЛитССР,
Вильнюс

Поступила 9.09.1989

MULTIPLE MOLECULAR FORMS OF NAD DEPENDENT MALATE DEHYDROGENASES IN THREE TREMATODE SPECIES OF THE GENUS NOTOCOTYLUS (TREMATODA, NOTOCOTYLIDAE)

A. P. Paulauskas

Key words: NAD malate dehydrogenase, isoenzymes, polymorphism, Notocotylus

S U M M A R Y

NAD dependent malate dehydrogenases of three trematode species, *Notocotylus attenuatus*, *N. ephemera* and *N. imbricatus*, have been investigated by electrophoresis. Seven different zones with 15 isoenzymes in *N. attenuatus*, 16 isoenzymes in *N. ephemera* and 11 isoenzymes in *N. imbricatus* have been found in MDH spectra. Isoenzymes of MDH are controlled by seven polymorphic locuses. The activity of isoenzymes of three slowly migrating zones is 10 and more times higher than that of fast zones (4—7). The genotypes of adults in one strain are genetically identical, independent of the development in different definitive hosts. The spectra of MDH of the investigated *Notocotylus* species are different in slowly migrating isoenzymes (1—3 zones).
